



دوفصلنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال دوازدهم، شماره ۱، صفحه ۲۳ - ۱۷ (شهریور ۱۳۸۸)

تولید یک کلون از یاخته‌های پایدار کلیه گوساله و ارزیابی حساسیت آن در برابر ویروس‌های پارائنفولانزا تیپ سه و هرپس سیمپلکس تیپ یک

یاشار محمدزاده صدیق^۱، دکتر محمد حسن روستایی^۲، دکتر حوریه سلیمان جاهی^{۳*}، عباس بختیاری^۴

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ استاد گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ استادیار گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۴ کارشناس ویروس‌شناسی، بخش ویروس‌شناسی دام، موسسه واکسن و سرم سازی رازی

چکیده

زمینه: مطالعه حاضر جهت تولید کلون از یاخته‌های مداوم کلیه گوساله و ارزیابی حساسیت کلون‌های سلولی تولید شده در تکثیر ویروس‌های پارائنفولانزا تیپ سه و هرپس سیمپلکس تیپ یک به منظور به کارگیری آن‌ها در تولید بذر ویروس انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش با روش تهیه رقت‌های متوالی و با بهره‌گیری از رده سلولی Vero غیرفعال شده به عنوان لایه تغذیه‌کننده اقدام به کلون کردن یاخته‌های رده کلیه گوساله (BK) شد. پس از ظهور کلون‌های سلولی با حذف لایه تغذیه‌کننده، سلول‌های تازه جوانه‌زده از یک کلون جدا شدند و در شرایط مناسب کشت داده شدند. رده سلولی به دست آمده از لحاظ تکثیر ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ یک (به عنوان DNA ویروس) و پارائنفولانزا تیپ سه (به عنوان RNA ویروس) قبل و بعد از کلون‌سازی یاخته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از کلون‌سازی یاخته‌های BK در این تحقیق نشان داد که تغییر عیار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک بر روی یاخته‌های BK (قبل و بعد از کلون‌سازی) معنی‌دار نبود، اما اختلاف تکثیر ویروس پارائنفولانزا تیپ سه بر روی رده BK-O (قبل از کلون‌سازی) و BK-C (بعد از کلون‌سازی) از لحاظ آماری معنی‌دار بود. لذا رده‌های فوق قبل و بعد از کلون‌سازی از لحاظ کاربیلوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند و نشان داده شد که سلول‌های کلون‌شده نسبت به سلول‌های کلون نشده هم از نظر مورفولوژی و هم از لحاظ کاربیلوژی همگن‌تر هستند.

نتیجه‌گیری: یاخته‌های کلون شده BK در مقایسه با یاخته‌های کلون نشده دارای کاربیلوژی منظم‌تر بوده و حساسیت آن به ویروس پارائنفولانزا تیپ سه کمتر از یاخته کلون نشده بود.

واژگان کلیدی: کلون‌سازی، یاخته‌های BK، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، ویروس پارائنفولانزا تیپ ۳، کاربیلوژی

دریافت مقاله: ۸۶/۷/۳ - پذیرش مقاله: ۸۶/۱۰/۲۲

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی، ص پ: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

مقدمه

استفاده از کشت یاخته برای تکثیر و تعیین هویت بسیاری از ویروس‌ها از جمله روش‌هایی است که در تمام آزمایشگاه‌های ویروس‌شناسی و تولید واکسن‌های ویروسی در جهان مرسوم است (۱). یکی از مهم‌ترین فاکتورهای که در زمان بهره‌گیری از یاخته‌های پستانداران در ویروس‌شناسی باید به آن توجه کرد این است که یاخته‌ها باید حداکثر همسانی را داشته باشند (۲). برای به دست آوردن یاخته‌های یکنواخت از روش کلون‌سازی یاخته استفاده می‌شود (۲ و ۳). انواع یاخته‌ها را می‌توان در یک دسته‌بندی به سه قسمت مجزا از هم تقسیم کرد، یاخته‌های اولیه، یاخته‌های دیپلوئید یا نیمه مداوم و رده‌های مداوم (یاخته‌های نامیرا) که یاخته‌های آنوپلوئیدی (aneuploid) هستند که پاساژهای نامحدودی را تحمل می‌نمایند. این یاخته‌ها ثبات ژنتیکی ندارند (۲) و در نتیجه می‌توانند به‌طور مداوم رشد و تکثیر یابند و نتیجه آن پیدایش انواعی از یاخته‌های ناهمگن در کشت است. کلون به جمعیتی از یاخته‌ها اطلاق می‌شود که همگی از یک یاخته مادری واحد منشأ گرفته‌اند (۳) و کلون‌سازی برای به حداقل رساندن تنوع ژنتیکی و فنوتیپی در جمعیتی از یاخته‌ها بکار گرفته می‌شود. در مورد کلون‌سازی باید اشاره کرد که کلون‌سازی همگن بودن نسل‌های بعدی از رده‌های کلون شده را تضمین نمی‌کند. بسیاری از یاخته‌ها در کشت از نظر فنوتیپی هتروژن هستند و گاهی این یک صفت ذاتی است و حتی با کلون‌سازی‌های پی در پی نمی‌توان آنرا حذف کرد. نکته دیگر این‌که کلون‌سازی مستلزم تکثیر یاخته‌ها در تعداد کم می‌باشد و این یک مورد غیرفیزیولوژیک است. برای جبران این اشکال در کلون‌سازی از کشت

تک لایه رده بخصوصی که غیرفعال شده‌است و توانایی تکثیر ندارد به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده استفاده می‌شود. برای کلون کردن یاخته‌ها روش‌های متعددی وجود دارد که روش تهیه رقت از روش‌های پر کاربردی است که بدین منظور استفاده می‌شود. این روش براساس تهیه رقت‌های متوالی از یاخته‌ها و تکثیر یاخته‌های موجود در بالاترین رقت‌ها استوار است، بنابراین دقت این روش به تعداد یاخته‌هایی بستگی دارد که در ظرف چند خانه‌ای توزیع می‌گردد.

مواد و روش کار

کشت یاخته‌ها: یاخته‌های کلیه گوساله BK^۱ (مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) و Vero (بانک سلولی انستیتو پاستور) در محیط DMEM^۲ غنی‌شده با ۷ درصد سرم کشت داده شدند. بدین منظور به محیط کشت یاخته‌ها جنتامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، پنی-سیلین (۱۰۰ واحد بر لیتر) و استرپتومایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه شد. غلظت بی‌کربنات سدیم محیط کشت برای ۵ درصد دی‌اکسید کربن موجود در فاز گازی انکوباتور تنظیم گردید و محیط کشت با فیلتر فشار مثبت استریل شد (۳-۱).

یاخته‌های BK در ابتدا به محیط کشت DMEM عادت داده شدند و کشت یاخته بر اساس روش‌های رایج انجام شد (۳). برای شمارش یاخته‌ها از لام نئوبار و روش استاندارد استفاده شد (۴ و ۵). برای انجام یاخته‌ها از مخلوط DMSO^۳ و سرم به غلظت ۱۰ درصد از DMSO استفاده شد. یاخته‌های فریز شده درون لوله‌های کرایو در فریزر -۷۰ درجه

^۱ Bovine Kidney^۲ Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium^۳ Dimethyl sulfoxide

سانتی‌گراد و تانک ازت مایع نگهداری شدند.

تکثیر ویروس‌ها: برای تکثیر ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ یک (ایزوله ایران- تربیت مدرس) و پاراآنفلوانزا تیپ سه (ایزوله ایران- موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) از تک لایه یاخته‌های BK استفاده شد. بدین منظور ویروس‌ها با $MOI=0.1$ ^۴ به یاخته‌هایی که ۷۰ درصد سطح فلاسک را پوشانده بودند اضافه گردید و پس از سپری شدن یک‌ساعت جذب بر روی یاخته‌ها تعلیق ویروسی جذب نشده خارج و محیط DMEM اضافه شد و پس از تشکیل CPE^۵ به میزان ۸۰ درصد ویروس‌ها جمع‌آوری و در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تأیید وجود ویروس پاراآنفلوانزا تیپ سه از تست همادزورپشن با بهره‌گیری از تعلیق گویچه‌های قرمز ۰/۴ درصد خوکچه هندی نیز استفاده شد (۶).

کلون‌سازی: برای به دست آوردن کلون از یاخته‌های هدف، سوسپانسیون سلولی با رقت بسیار بالا تهیه شد و در مقادیر پایین بر روی لایه تغذیه کننده (feeder layer) کشت داده شدند. سپس کلونی‌های حاصل از رشد یاخته‌ها به ظروف بزرگتر انتقال داده شد تا در نهایت یک رده همگنی از یاخته‌ها حاصل آید. برای تهیه لایه تغذیه‌کننده قبل از کلون سازی یاخته‌های Vero درون میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای به تعداد ۱۰۵ سلول بر میلی‌لیتر کشت داده شد، سپس با میتوماکسین C (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان اثر دهی ۳ ساعت) یاخته‌های Vero غیرفعال شدند (۱۰-۷). برای کلون‌سازی با استفاده از رقت‌های متوالی از تعلیق یاخته‌های BK با فواصل ۱ لگاریتم تهیه و سپس (رقت ۰/۲۵ سلول بر میلی‌لیتر و ۰/۵ سلول بر میلی‌لیتر) درون چاهک‌های میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای

کشت داده شدند. پس از ظهور کلونی، برای برداشت کلنی از حلقه‌های کلونینگ^۶ (۳ و ۶)، حذف لایه تغذیه‌کننده توسط EDTA ۰/۰۲ درصد (۱۱) و برداشت کلونی با کمک پی‌پت پاستور نازک شده استفاده شد (۳). برای تکثیر و زیاده‌سازی سلول‌ها، کلونی‌های برداشت شده در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد، سپس بعد از تشکیل مونولایر کامل به ترتیب به میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای و ۶ خانه‌ای و در نهایت به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی انتقال داده شد. یک کلونی به طور اتفاقی انتخاب و تکثیر داده شد (BK-C) و سپس روند تکثیر ویروس‌های هرپس و پاراآنفلوانزا تیپ سه بر روی آن‌ها برای مقایسه با یاخته‌های مادری (BK-O) به کار گرفته شد.

کاریو تایپینگ: برای تهیه کاریوتاایپ از یاخته‌های BK، از کلشی‌سین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (۳ و ۱۷-۱۲). محلول هیپوتونیک از KCl تهیه و با غلظت ۷۵ میلی‌مولار به کار گرفته شد.

مقایسه قدرت تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و پاراآنفلوانزا تیپ سه بر روی یاخته‌های BK-C و BK-O:

یاخته‌های BK-O و BK-C که از نظر تعداد سلول و سلامت یاخته‌ای هر دو در وضعیت مشابه به سر می‌بردند، انتخاب شدند. ابتدا، هر دو رده یاخته‌ای به طور هم‌زمان تریپسینه شدند و از آن‌ها تعلیق یاخته‌ای یکنواختی بدست آمد. شمارش یاخته‌ها انجام و تعداد یاخته‌های مساوی از هر دو رده بدست آمد و در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی جدید توزیع شدند. به هر فلاسک حاوی تعداد یاخته شمارش شده ۶

^۶ cloning rings

^۴ Multiplicity of infection

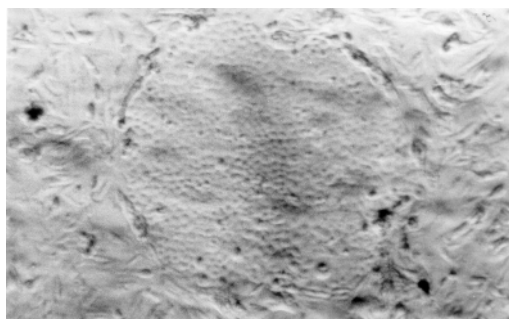
^۵ Cytopathic effect

روز به بیست و چهار یاخته و در روز پانزدهم به تعداد 10^{4-5} یاخته رسیده بود.

جدول ۱: وضعیت تکثیر یاخته‌های BK

| هنگام کلون‌سازی | |
|--|------------------|
| روز صفر | ۰/۲۵ یاخته |
| روز نهم | ۲۱ یاخته |
| روز دهم | ۲۴ یاخته |
| روز یازدهم | ۵۶ یاخته |
| روز دوازدهم | ۶۸ یاخته |
| روز سیزدهم | ۸۲ یاخته |
| روز چهاردهم | 10^2 یاخته |
| روز پانزدهم | 10^{4-5} یاخته |
| روز بیست و چهارم | |
| برداشت کلونی به روش حذف لایه تغذیه کننده | |

همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، در روز بیست و چهارم برداشت کلونی به روش حذف لایه تغذیه‌کننده انجام شد که نتایج حاصل از آن در شکل ۱ دیده می‌شود.



شکل ۱: کلون تکثیر یافته روی لایه تغذیه کننده

عیار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در زمان تلقیح به سلول‌های مادری و کلون شده $TCID_{50}$ ، $10^{7/8}$ محاسبه گردید و MOI استفاده شده در این تحقیق برای ارزیابی قدرت تکثیر ویروس بر روی یاخته‌های فوق (BK-C و BK-O) برابر با ۰/۲ محاسبه شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در ۳۲

میلی‌لیتر از محیط کشت دارای ۷ درصد سرم ریخته شد. حجم محیط کشت و نوع آن برای هر دو فلاسک نیز یکسان تهیه شده بود و برای هر دو فلاسک شرایط کاملاً یکسانی برای رشد یاخته‌ها در نظر گرفته شد. پس از ۸ ساعت که اکثر یاخته‌ها فقط امکان اتصال به سطح را یافته بودند و پس از خارج کردن محیط کشت هر دو فلاسک، میزان معین و مساوی از ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ به دو فلاسک واجد سلول تلقیح شد. مدت یک ساعت جذب ویروس به سطح یاخته‌ای برای هر دو فلاسک در نظر گرفته شد. پس از سپری شدن یک ساعت زمان جذب، سطح هر دو فلاسک با $CMF-PBS^7$ شستشو داده شد. مجدداً ۶ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم نگهدارنده به فلاسک‌ها افزوده شد. در این هنگام به عنوان ساعت صفر از محیط افزوده شده به درون هر فلاسک به مقدار ۲ میلی‌لیتر نمونه‌گیری گردید و در لوله‌های جداگانه جمع‌آوری شد. مجدداً ۲ میلی‌لیتر محیط کشت استریل واجد سرم (۲ درصد) به فلاسک‌ها افزوده شد. نمونه‌های اول و دوم به فاصله ۴ ساعت پس از تلقیح و نمونه‌های بعد هر کدام به فاصله ۸ ساعت تهیه و به فریزر $-70^\circ C$ درجه انتقال داده شد و $TCID_{50}$ نمونه‌ها به طور همزمان اندازه‌گیری شد (۱۸). هنگام نمونه‌گیری وضعیت تشکیل CPE در فلاسک‌ها با معیار ۱+، ۲+، ۳+ و ۴+ ثبت گردید.

یافته‌ها

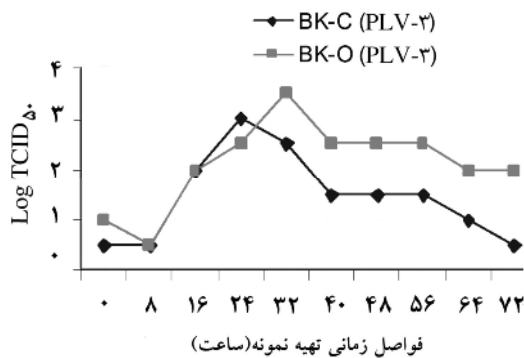
نتایج مربوط به کلون‌سازی یاخته‌های BK در جدول شماره ۱ در وضعیتی که ۰/۲۵ یاخته در هر چاهک وجود دارد نشان داده شده است، که بعد از گذشت ده

⁷ Calcium Magnesium Free - Phosphate Buffered Saline

⁸ %50 Tissue Culture Infectious Dose

عیار ویروس پاراآنفلوانزا تیپ سه قبل از تلقیح به سلول‌های هدف TCID₅₀ ۱۰۷/۶ محاسبه شد و MOI برای ارزیابی قدرت تکثیر ویروس بر روی یاخته‌های BK-C و BK-O با در نظر داشتن ۱۰۶ یاخته از هر رده در میلی‌لیتر برابر با ۴ محاسبه شد.

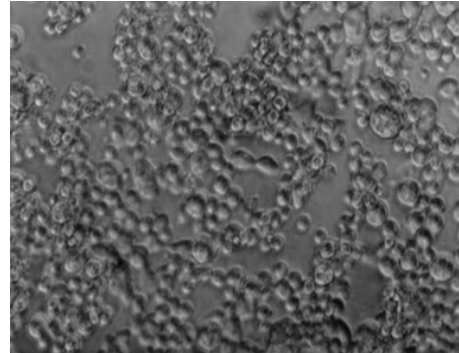
عیار ویروس‌های پارا آنفلوانزا تولید شده در یاخته‌های BK-C و BK-O در فواصل زمانی ذکر شده به ساعت در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه قدرت تکثیر ویروس پاراآنفلوانزا تیپ سه در یاخته‌های BK-C و BK-O. همانطور که مشاهده می‌شود در ساعات اولیه تکثیر فقط ویروس‌های تلقیح شده موجود در محیط کشت قابل نشان دادن هستند، آنگاه از ساعت ۱۶ به بعد که دوره محاق (eclipse period) تمام می‌شود ویروس‌های جدید وارد محیط می‌شوند. این روند تا تخریب کامل یاخته‌ها توسط ویروس‌ها ادامه دارد (ساعت سی‌ودوم) که پس از آن نمودار سیر نزولی طی می‌کند.

کاربوتایپینگ: نمودارهای شماره ۳ و ۴ به ترتیب تعداد کروموزوم یاخته‌های BK را قبل از کلون‌سازی و بعد از کلون‌سازی در پاساژ سوم نشان می‌دهد (نمودارهای شماره ۳ و ۴)

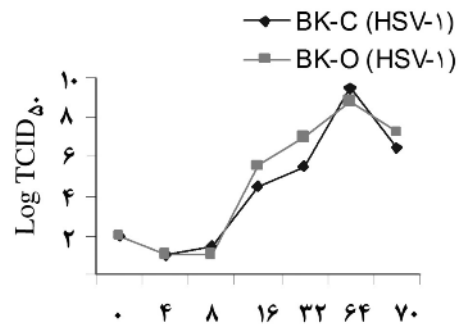
ساعت بعد از عفونت زایی به اوج خود می‌رسد و متعاقب آن آثار تخریب سلولی (CPE) در سلول‌ها مشاهده می‌شود.



شکل ۲: آثار تخریب سلولی (CPE) در سلول‌ها ناشی از

تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

نمودار شماره ۱ مقایسه قدرت تکثیر و ارزیابی عیار ویروس‌های هرپس سیمپلکس تولیدشده در یاخته‌های BK-C و BK-O در فواصل زمانی ذکر شده (ساعت‌های مختلف بعد از تلقیح) را نشان می‌دهد (نمودار ۱).



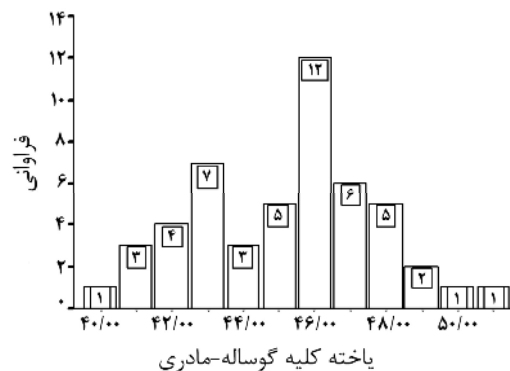
فواصل زمانی تهیه نمونه (ساعت)، پس از تلقیح ویروس

نمودار ۱: مقایسه قدرت تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در یاخته‌های BK-C و BK-O. در ساعات اولیه تکثیر فقط ویروس‌های تلقیح شده موجود در محیط کشت قابل نشان دادن هستند، از ساعت ۱۶ به بعد که دوره محاق (eclipse period) تمام می‌شود ویروس‌های جدید وارد محیط می‌شوند. این روند تا تخریب کامل یاخته‌ها توسط ویروس‌ها ادامه دارد (ساعت سی‌ودوم تا شصت و چهار ساعت بعد از عفونت) و پس از آن نمودار سیر نزولی طی می‌کند.

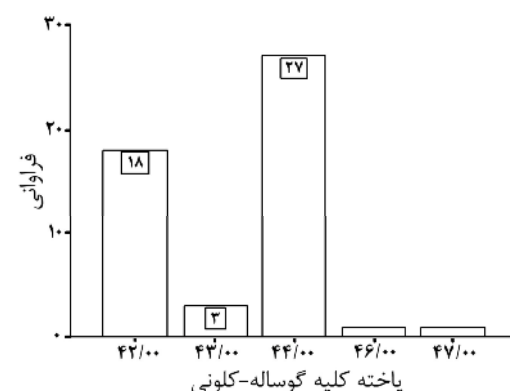
در این تحقیق برای کلون کردن یاخته‌های BK لایه تغذیه‌کننده به کار گرفته شد. این لایه از یاخته‌های غیرفعال شده Vero تهیه شد که در شرایط طبیعی قادرند تا سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد سلولی از جمله PDGF^۹، β و TGF α ^{۱۰} را تولید کند، که احتمالاً در اتصال و رشد کلون‌های جدید سلولی نقش مؤثر ایفا می‌نمایند (۱۹-۲۲).

در مورد یاخته BK، میانگین کاربوتایپ‌های تهیه شده در پاساژ مجهول (برای ۵۰ پلاک کروموزومی) ۴۵/۳ با انحراف معیار برابر با ۲/۶ بود که در نتیجه دامنه 2n برابر با ۵۳-۴۰ به دست آمد. کاربوتایپ پاساژ سوم یاخته‌های BK کلون شده انحراف معیار کوچکتری نسبت به رده یاخته‌ی مادری خود نشان می‌داد به طوری که میانگین آن ۴۳/۳ و انحراف معیار آن برابر با ۱/۱ (2n=۴۲-۴۷) بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود مقدار انحراف معیار پس از کلون‌سازی کمتر شده است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با کاسته شدن از مقدار انحراف معیار پس از کلون‌سازی یکدستی بیشتری از لحاظ کاربولوژی در یاخته‌ها بوجود خواهد آمد.

مطالعه حاضر نشان داد که تکثیر ویروس در دو یاخته مادری و کلون‌شده امکان پذیر بوده و اختلاف معنی‌داری بین عیار حاصل از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در این یاخته‌ها مشاهده نشد. در بررسی عیار ویروس پارائنفولانزا تیپ سه در این یاخته‌ها عیار ویروس تا ۴۰ ساعت روند افزایشی را نشان می‌دهد، اما از ساعت ۴۰ تا ۵۶ بعد از تلقیح عیار ویروس نسبتاً ثابت است. با توجه به نمودار ۲ این گونه استنباط می‌شود که در زمان صفر ویروس پارائنفولانزا کمتری توانسته به سطح یاخته‌های BK-O



نمودار ۳: کاربوتایپ یاخته‌های BK قبل از کلون‌سازی.



نمودار ۴: کاربوتایپ یاخته‌های BK در پاساژ سوم بعد از کلون‌سازی

همان‌طور که مشاهده می‌شود سلول‌های کلون‌شده الگوی کاربوتایپی همگن‌تری نسبت به سلول‌های مادری نشان می‌دهند.

بحث

از ویژگی‌های رده‌های مداوم (نامیرا)، نداشتن ثبات ژنتیکی در آن‌ها است (۳ و ۱۸). این یاخته‌های به طور مداوم رشد و تکثیر می‌یابند و در نتیجه انواعی از یاخته‌های ناهمگن در کشت بوجود می‌آید. با توجه به این ناهمگونی لازم است تا یاخته‌های یکسانی از این رده‌ها تولید و برای مطالعه ویروس‌ها مورد استفاده قرار گیرد. این کار کلون‌سازی یاخته‌ها نامیده می‌شود.

^۹ Platelet-Derived Growth Factor

^{۱۰} Transforming growth factor alpha

در این رده کمتر از BK-O می باشد، لذا به نظر می رسد سلول در طی کلون سازی صفاتی را از دست داده که منجر به افت عیار ویروس در سلول کلون شده گردیده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر خدمتی از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی به لحاظ تأمین سلول BK تشکر و قدردانی می شود.

اتصال یابد و این برخلاف آن چیزی است که در یاخته های BK-C رخ داده است. همچنین نشان می دهد که در یاخته های BK-O عیار بیشتری از ویروس نسبت به یاخته های BK-C به دست آمده است. اختلاف بین عیار ویروس های پارائنفولانزا تیپ سه تولید شده در BK-C و BK-O بنابر آزمون تی معنادار بود. علی رغم اتصال ویروس به تعداد زیاد در یاخته های BK-C عیار ویروس پارائنفولانزا تیپ سه

References:

1. Freshney RI. Culture of Animal Cells. New York: Willey-Liss, 1994, 161-74.
2. Morgan SJ, Darling CD. Animal cell culture. London: Bios Scientific Publishers, 1993, 79-91.
3. Cann A. Virus Culture: A Practical Approach. New York: IRL-Press, 1999, 1-31.
4. Davis JM. Basic cell culture: A Practical Approach. New York: IRL-Press, 1994, 233-41.
5. Paul J. Cell and tissue culture. London: Churchil-Livingstone, 1975, 354-85.
6. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. vol 2. USA: ASM Press, 1990, 1-5.
7. Grigoreiv VG, Grigorieva T, Moerman EJ, et al. Senescent Fibroblast as Feeder cells for lymphoid cell cloning. Anal Biochem 1995; 236:250-4.
8. Butche RN, McCullough KC, Bryand J. Mitomycin C- Treated 3T3/B (3T3/A31) cell feeder layers in hybridoma technology. J Immunol Methods 1988; 107:245-51.
9. Collier HA, Collier BS. Poisson statical Analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. Methods Enzymol 1986; 121: 412-7.
10. Martin G, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of Teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies In Vitro. Proc Natl Acad Sci 1975; 72: 1441-5.
11. Sabatini LM, Allen-Hoffmann BL, Warner TF, et al. Serial cultivation of epithelial cells from human and macaque salivary glands. In Vitro Cell Dev Biol 1991;27A: 939-48.
12. Worten RG, Duff C. Karyotyping. Methods Enzymol 1979; 58: 322-8.
13. Saha SN. Studies on morphology karyology and growth pattern of PK-15 cell line. Indian Vet J 1987;447-51.
14. Saha SN, Rao BU. Comparative studies on two cell lines of IB-RS-2. Indian Vet J 1984; 61:817-20.
15. Saha SN, Sen AK. Studies selection of suitable cell system for adaptation, titration and plaque assay of Foot and Mouth Disease Virus Type A. Indian Vet J 1987; 64:541-5.
16. Schramayr S, Caporossi D, Mal I., et al. Chromosomal Damage Induced by Human Adenovirus type 12 requires expression of the E1B 55-Kilodalton Viral protein. J Virol 1990; 64:2090-5.
17. Specter S, Hodinka RL, Young SA. Clinical Virology Manual. Washington DC: ASM Press; 2000.
18. Bosque P, Prusiner S. Culture cell sublines highly susceptibles to prion infection. J Virol 2000; 74:4377-86.
19. Richmon Virginia, Coculture cells that express LIF enhance mouse blastocyst in vitro. J Assist Reprod Genet 1995; 12:153-6.
20. Aline P, Taupin J, Mayer G, et al. Human interleukin for DA cells of leukemia inhibitory factor is released by Vero cells in human embryo coculture. Fertil Steril 1991; 62:648-50.
21. Carngier JA, Morgan JJ, Mc Diarmid N, et al. Influence of protein supplements on the secretion of leukemia inhibitory mitomycin-pretreated vero cells: possible application to the in vitro production of bovine blastocysts with high cryotolerance. J Reprod Fertil 1999; 117: 41-8.
22. Jian-Loung H, Yu H, Yieh-loong T, et al. Cytokines and growth factors secreted by vero cells destined for embryo cocultures. Tzu Chi Med J 1998; 10:175-80.